

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011451284

WPI Acc No: 1997-429191/*199740*

XRAM Acc No: C97-137219

Preparation of hydroxyalkanoic acid copolymer with high 4-hydroxybutyrate content - comprises extraction of copolymer from microbe by mixing surfactant-containing acetone with wet microbe body and heating

Patent Assignee: MEIJI SEIKA KAISHA LTD (MEIJ); TAISEI CONSTR CO LTD (TAKJ)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 9191893	A	19970729	JP 968577	A	19960122	199740 B

Priority Applications (No Type Date): JP 968577 A 19960122

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 9191893	A		6	C12P-007/62	

Abstract (Basic): JP 9191893 A

The preparation is of a hydroxyalkanoic acid copolymer which comprises 3-hydroxybutyrate (3HB) unit and 4-hydroxybutyrate (4HB) unit. The process involves extracting and separating the hydroxyalkanoic acid copolymer accumulated in the body of a microbe. The extraction of the hydroxyalkanoic acid copolymer is carried out by mixing a surfactant containing acetone with the wet body of the microbe and heating.

ADVANTAGE - There is no need for drying of the microbe body and the extraction can be effected in a short period. A copolymer of high 4HB content can be separated selectively.

Dwg.0/0

Title Terms: PREPARATION; HYDROXY; ALKANOIC; ACID; COPOLYMER; HIGH; BUTYRATE; CONTENT; COMPRISE; EXTRACT; COPOLYMER; MICROBE; MIX; ACETONE; WET; MICROBE; BODY; HEAT

Derwent Class: A23; D16

International Patent Class (Main): C12P-007/62

International Patent Class (Additional): C08G-063/06; C12P-007/62;

C12R-001-01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C; A05-E02; A10-D05; A10-G01B; D05-C; D05-H13

Polymer Indexing (PS):

<01>

001 018; G2120 G2108 D01 D60 F35 D11 D10 D50 D84 F27 F26 F36; R24028 P0599 D01 D11 D10 D50 D63 D84 F41; H0022 H0011; P1978-R P0839 D01 D50 D63 F41; L9999 L2528 L2506; L9999 L2186-R

002 018; ND03; ND07; Q9999 Q8082; N9999 N6655-R; N9999 N5890 N5889; N9999 N6439; N9999 N6177-R; N9999 N6780-R N6655; K9665

003 018; C999 C044 C000; C999 C282; C999 C306

004 018; A999 A566-R

005 018; R00272 G1525 D01 D11 D10 D50 D83 F23; A999 A475

Derwent Registry Numbers: 1207-S; 1706-S

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-191893

(43) 公開日 平成9年(1997)7月29日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62			C 1 2 P 7/62	
C 0 8 G 63/06	N L Q		C 0 8 G 63/06	N L Q
// (C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平8-8577	(71) 出願人	000206211 大成建設株式会社 東京都新宿区西新宿一丁目25番1号
(22) 出願日	平成8年(1996)1月22日	(71) 出願人	000006091 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号
		(72) 発明者	斎藤 祐二 東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成建設株式会社内
		(72) 発明者	友沢 孝 東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成建設株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 3-ヒドロキシブチレート単位(3HB成分)と4-ヒドロキシブチレート単位(4HB成分)とからなるヒドロキシアルカン酸共重合体生産能を有する微生物の菌体内に蓄積された前記ヒドロキシアルカン酸共重合体を抽出・分離する工程を含む前記共重合体の製造方法において、前記共重合体の抽出を、前記菌体の湿菌体に界面活性剤含有アセトンを混合し、加熱することにより行うことを特徴とする、製造方法。

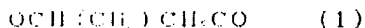
【効果】 湿菌体から前記共重合体を抽出することができるため菌体の乾燥を行う必要がなく、しかも抽出時間も短縮することができるので、製造工程の効率化を図ることができる。更に、菌体に3HB成分含量の高い共重合体と4HB成分含量の高い共重合体とが蓄積されている場合に、1HB成分含量の高い共重合体を容易に精度よく選択的に分離・精製することができる。

α-4HB) という。)を微生物を用いて製造する方法を提供することにある。特に、本発明は、微生物菌体内に3HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)と、4HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)が蓄積される場合に、4HB成分含量が高いP(3HB-co-4HB)(通常、4HB成分含量が60モル%以上のもの)を該菌体から選択的に抽出することが可能なヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法を提供することを課題とする。

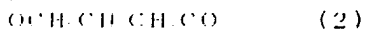
【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、下記式(1)：



で表される3-ヒドロキシブチレート単位(3HB成分)と、下記式(2)：



で表される4-ヒドロキシブチレート単位(4HB成分)とからなるヒドロキシアルカン酸共重合体(P(3HB-co-4HB))生産能を有する微生物の菌体内に蓄積された前記ヒドロキシアルカン酸共重合体を抽出・分離する工程を含む前記ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法において、前記ヒドロキシアルカン酸共重合体の抽出を、前記菌体の湿菌体に界面活性剤含有アセトンを含し、加熱することにより行うことを特徴とする、ヒドロキシアルカン酸共重合体の製造方法を提供するものである。

【0009】本発明においては、微生物菌体内に蓄積された上記P(3HB-co-4HB)の抽出を、界面活性剤を含有するアセトンと混合して加熱することにより行う。この場合、湿菌体をそのまま界面活性剤含有アセトンに混合すればよいので菌体を乾燥する必要がなく、生産性、経済性に優れる。また、湿菌体と界面活性剤含有アセトンとを混合して加熱する際の加熱温度はアセトンの沸点程度又はそれ以上であれば問題はなく、好ましくは50〜60℃である。加熱温度が低すぎると抽出効率及び抽出速度が低下する。更に、抽出時間は、通常3〜10時間程度である。

【0010】界面活性剤の種類は特に限定されず、具体的には、N-アルキルアミノ酢酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルケンスルホン酸塩、脂肪酸塩、硫酸エステル塩、硫酸アルキルフェニルポリオキシエチレン塩、硫酸アルキルポリオキシエチレン塩、リン酸アルキルポリオキシエチレン塩等の陰イオン界面活性剤；アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル、アルキルポリオキシエチレンエーテル、脂肪酸ポリオキシエチレンエステル、Tween系界面活性剤(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン、N-ヒドロキシエチルアルカンアミド等の非イオン界面活性剤；1-(2-アシルアミノエチル)-1-メチル-2-アルキルイミダゾリニウム塩、アルキルトリメチルアンモニウム塩、アルキ

ルピリジニウム塩、アルキルベンジルジメチルアンモニウム塩、アルキルメチルジポリエトキシアンモニウム塩等の陽イオン界面活性剤；N-アルキルアミノ酸、N-アルキルジメチルアミノ酸、アルキルジメチルアミノキシド等の両性界面活性剤が例示され、これらの中で好ましいのは陰イオン界面活性剤及び非イオン界面活性剤であり、更に好ましいのはTween80及びドデシル硫酸ナトリウムである。

【0011】また、アセトン中の界面活性剤の配合量は、0.05〜0.5重量%の範囲が好ましい、界面活性剤の配合量が高すぎると抽出したP(3HB-co-4HB)に界面活性剤が混在するとともにP(3HB-co-4HB)の分子量の低下を招き、界面活性剤の配合量が低すぎると抽出効率が低下する。

【0012】菌体から上記P(3HB-co-4HB)を抽出した後、P(3HB-co-4HB)を回収するには、従来公知の方法で行うことができる。具体的には、上記菌体とアセトンの混合液から菌体残渣を濾過又は遠心分離により除去し、次いで残ったアセトン溶液を貧溶媒と混合してP(3HB-co-4HB)を析出させることによりP(3HB-co-4HB)を回収することができる。貧溶媒の種類は特に限定されず、具体的にはメタノール、ヘキサン、ペンタン、水等が例示され、好ましいのはメタノール及びヘキサンである。

【0013】本発明で用いる微生物は、P(3HB-co-4HB)生産能を有する微生物であればいずれのものでもよい。例えば、コマモナス(*comamonas*)属、アルカリゲネス(*Alcaligenes*)属、ロドコッカス(*Rhodococcus*)属等に属するものであって、P(3HB-co-4HB)生産能を有する微生物が挙げられる。具体的には、コマモナス アシドボランズ(*Comamonas acidovorans*)、アルカリゲネス ユートロファス(*Alcaligenes eutrophus*)、アルカリゲネス ラタス(*Alcaligenes latus*)等がある。入手容易な菌株としては、コマモナス アシドボランズ HBH3852、アルカリゲネス ユートロファスATCC 17699、アルカリゲネス ユートロファスATCC 11591、アルカリゲネス ラタスATCC 29713、ロドコッカス sp. NCIMB 40126、ロドコッカス sp. ATCC 19070等がある。

【0014】上記のような微生物の菌体内にP(3HB-co-4HB)を蓄積させるには、微生物をその微生物の種類に応じた適当な培地に接種して、常法にしたがって培養して増殖させればよい。培地としては、公知のものをいづれも使用できるが、コマモナス属に属する微生物を用いる場合、炭素源としては、3-ヒドロキシ酪酸及び4-ヒドロキシ酪酸を使用する。その他の炭素源として、炭素原子数が偶数のアルカンジオール、γ-ブチラクトン、4-アミノ酪酸等が例示される。その他、培地のpH、培養温度、培養時間等の培養条件も微生物の種類により適宜設定する。

実施例	ポリマー	割合 (重量%)	組成 (モル%)	
			3HB成分	4HB成分
実施例6	実施例1で得られた P (3HB-co-6%4HB)	可溶ポリマー	92	36
		不溶ポリマー	8	71
実施例7	実施例2で得られた P (3HB-co-6%4HB)	可溶ポリマー	91	22
		不溶ポリマー	9	81
実施例8	実施例3で得られた P (3HB-co-8%4HB)	可溶ポリマー	88	18
		不溶ポリマー	12	68
実施例9	実施例4で得られた P (3HB-co-8%4HB)	可溶ポリマー	90	10
		不溶ポリマー	10	82

【0021】これらの実施例から、微生物によるP (3HB-co-4HB)の合成では、3HB成分含量が高いものと、4HB成分含量が高いものの2種類の共重合体が混合して得られる可能性があることがわかった。また、熱アセトンを用いることによって、4HB成分含量の高いP (3HB-co-4HB)を選択的に分離できることがわかった。

【0022】実施例10～13、実施例6～9で得られた熱アセトン可溶ポリマーを¹³C-NMRで解析した。40

MHz ¹³C-NMRにおけるカルボニル連鎖の相対ピーク面積から決定したダイアド連鎖のモル分率F₃₃、

F₃₄、F₄₃、及びF₄₄を表3に示す。また、熱アセトン可溶ポリマー中の3HB成分と4HB成分のダイアド連鎖のモル分率から、モノマー反応比の積であるD値を下記式により算出した結果も表3に示す。

$$D = (F_{33} \cdot F_{44}) / (F_{34} \cdot F_{43})$$

【0023】

【表3】

実施例	ポリマー	ダイアド連鎖のモル分率 ^{a)}				D値 ^{b)}
		F ₃₃	F ₃₄	F ₄₃	F ₄₄	
実施例10	実施例6の不溶ポリマー	0.14	0.18	0.18	0.50	2.2
実施例11	実施例7の不溶ポリマー	0.06	0.15	0.16	0.63	1.6
実施例12	実施例8の不溶ポリマー	0.03	0.13	0.14	0.70	1.2
実施例13	実施例9の不溶ポリマー	0.01	0.08	0.08	0.83	1.3

a) 400MHz ¹³C-NMRにおけるカルボニル連鎖の相対ピーク面積から決定

b) モノマー反応比の積 (D=F₃₃・F₄₄/F₃₄・F₄₃)

【0024】これらの結果から、各ポリマーともD値が1に極めて近いことが確認された。これは、統計的に3HB成分と4HB成分とがランダムに共重合していることを示している (例えば、Yuji Saito and Yoshiharu Doi, Int. J. Biol. Macromol., 16, 99-104 (1994)参照)。熱アセトン可溶ポリマーはP (3HB-co-4HB)ランダム共重合体であることが確認された。

【0025】実施例14～22、比較例1～4、実施例1にしたがって、4HB成分含量が84モル%のP (3HB-co-4HB)を発酵菌体重量当たり21重量%の含量で蓄積した菌体を得た。各実施例及び比較例において、表4に示した界面活性剤、即ちTween 80 (非イオン系界面活性剤)、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、陰イオン系界面活性剤)、又はCTAB (臭化セチルトリメチルア

ンモニウム、陽イオン系界面活性剤)をそれぞれ0.1重量%配合した300mlの抽出溶媒 (表4参照)に、前記菌体 (培養液300mlから遠心分離で得た湿菌体)を懸濁させた。得られた菌体懸濁液を、60℃に調整したウォーターバス内に浸してマグネチックスターラーで攪拌した5時間後、菌体懸濁液をPTFE製のメンブランフィルターで吸引ろ過し、得られた各アセトン溶液の100mlを、それぞれ表4に示した析出溶媒100mlに混合し、ポリマーを析出させた。

【0026】抽出前に菌体に含まれていたポリマーに対する抽出ポリマーの回収率 (重量%)を表4に示す。また、得られたポリマーの純度、組成 (3HB成分含量 (モル%)及び4HB成分含量 (モル%))、数平均分子量、並びに多分散度を表4に示す。尚、表中の比較例